

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 10-036271
(43)Date of publication of application : 10.02.1998

(51)Int.Cl. A61K 31/70
A61K 31/70
A61K 31/70
A61K 35/78
A61K 35/78
C07H 7/04

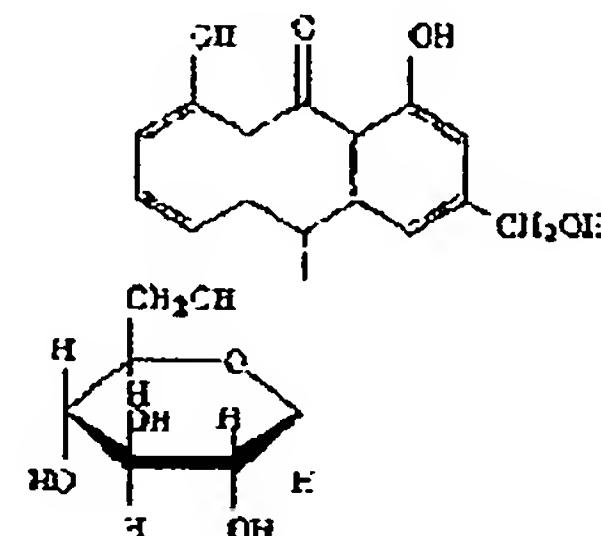
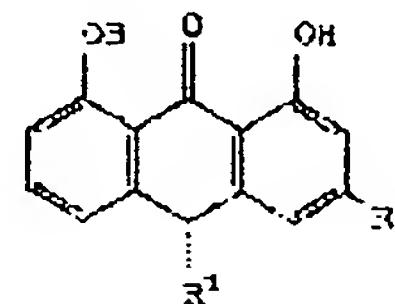
(21)Application number : 08-214316 (71)Applicant : KUREHA CHEM IND CO LTD
(22)Date of filing : 25.07.1996 (72)Inventor : SHOBU YOICHI
TSUZUKI TOMOKO
SHIRAGAMI TOSHIMI
MORINO MASAYOSHI
YOSHIKUMI CHIKAO

(54) SYNTHETIC SUPPRESSANT CONTAINING ALOIN DERIVATIVE FOR PROTEIN BELONGING TO HSP 27 (27kDa HEAT SHOCK PROTEIN) FAMILY

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain the subject synthetic suppressant capable of suppressing the synthesis of heat shock protein in cells and curing diseases such as cancer and multiple sclerosis by containing a specific aloin derivative as an active ingredient.

SOLUTION: This synthetic suppressant contains an aloin derivative of formula I (R1 is a hexose residue excluding a hydroxy group at the 1-position of hexose; R2 is a 1-3 C hydroxyalkyl). As this aloin derivative, aloin of formula II is preferable. Aloin is contained in a crude drug such as aloe and the like and obtained by extracting e.g. aloe with water (e.g. cold water, warm water or boiling water) or an organic solvent. By this suppressant, cancers relating to the change of normal cells to malignant tumors and the reduce of effect in the thermotherapy and autoimmune diseases such as multiple sclerosis and the like relating to the occurrence caused by heat shock protein from 16kDa to 40kDa in molecular weight can be effectively cured.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

BEST AVAILABLE COPY

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C): 1998,2003 Japan Patent Office

BEST AVAILABLE COPY

BEST AVAILABLE COPY

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平10-36271

(43)公開日 平成10年(1998)2月10日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
A 61 K 31/70	ADS		A 61 K 31/70	ADS
	AAA			AAA
	ABC			ABC
35/78	ADU		35/78	ADUV
	AGZ			AGZ

審査請求 未請求 請求項の数 3 FD (全 8 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願平8-214316	(71)出願人	000001100 呉羽化学工業株式会社 東京都中央区日本橋堀留町1丁目9番11号
(22)出願日	平成8年(1996)7月25日	(72)発明者	清輔 洋一 東京都新宿区百人町3-26-1-303
		(72)発明者	都築 智子 埼玉県蕨市北町4-8-26-106
		(72)発明者	白神 俊美 東京都小平市大沼町1-180-1-306
		(72)発明者	森野 真嘉 東京都練馬区光が丘3-7-2-207
		(72)発明者	吉汲 親雄 東京都国立市東2-19-46
		(74)代理人	弁理士 森田 審一

(54)【発明の名称】 HSP27ファミリーに属するタンパク質のアロイン誘導体含有合成抑制剤

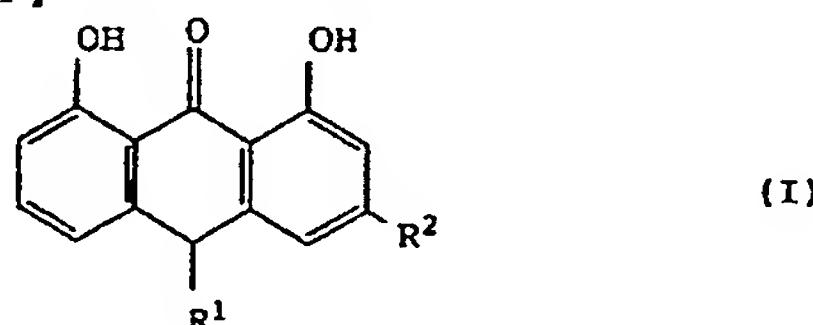
(57)【要約】

キル基)

【課題】 分子量16キロダルトンから40キロダルトンまでの間の熱ショックタンパク質(HSP27ファミリー)がその悪性化や温熱療法の効果の減少に関連する癌、又はHSP27ファミリーに属するタンパク質がその発症に関連する多発性硬化症などの自己免疫疾患の患者の生理学的状態を有効に改善させ、前記病気を効果的に治療することができる、HSP27ファミリーに属するタンパク質の合成抑制剤を提供する。

【解決手段】 下記一般式(I)で表されるアロイン誘導体を有効成分として含有する。

【化1】

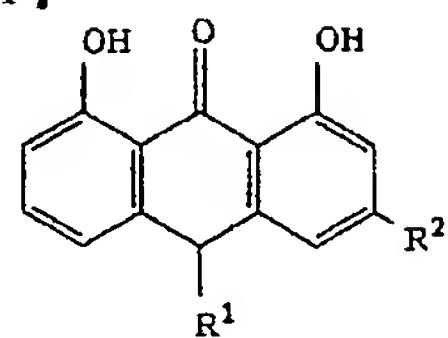


(式中、R¹は、ヘキソースの1位の水酸基を除いたヘキソース残基、R²は、炭素数1~3のヒドロキシアル

【特許請求の範囲】

【請求項1】 式(I) :

【化1】

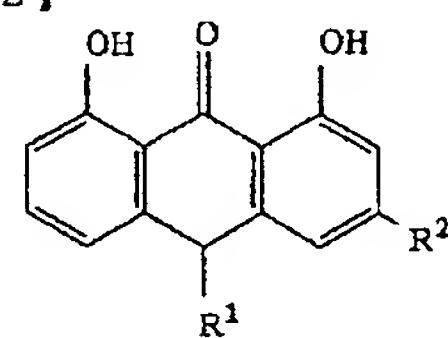


(I)

(式中、R¹は、ヘキソースの1位の水酸基を除いたヘキソース残基であり、R²は、炭素数1～3のヒドロキシアルキル基である)で表されるアロイン誘導体を有効成分として含有することを特徴とする、分子量16キロダルトンから40キロダルトンまでの間の熱ショックタンパク質の合成抑制剤。

【請求項2】 式(I) :

【化2】



(I)

(式中、R¹は、ヘキソースの1位の水酸基を除いたヘキソース残基であり、R²は、炭素数1～3のヒドロキシアルキル基である)で表されるアロイン誘導体を含有する植物の抽出物を有効成分として含有することを特徴とする、分子量16キロダルトンから40キロダルトンまでの間の熱ショックタンパク質の合成抑制剤。

【請求項3】 アロエの抽出物を有効成分として含有することを特徴とする、分子量16キロダルトンから40キロダルトンまでの間の熱ショックタンパク質の合成抑制剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、アロイン誘導体を有効成分として含有する、分子量が16キロダルトン(kD)から40kDまでの間の熱ショックタンパク質群(以下、HSP27ファミリーと称する)に属するタンパク質の合成抑制剤に関する。本発明によるHSP27ファミリーに属するタンパク質の合成抑制剤は、特に、HSP27ファミリーに属するタンパク質の組織内合成を抑制することによって、HSP27ファミリーに属するタンパク質が発症、悪性化、又は治療の障害に関与するものと考えられている病気、例えば、癌、又は多発性硬化症などの患者の生理学的状態を有効に改善させ、前記の病気を効果的に治療することができる。

【0002】

【従来の技術】 近年の化学療法、外科療法、放射線療法、及び免疫療法などの進歩にもかかわらず、依然とし

て癌による死亡原因に癌の悪性化が直接的又は間接的に関わっており、癌の悪性化の克服が今後の癌治療の大きな課題の一つとなっている。癌の悪性度は、癌の増殖性、浸潤性、又は転移性などによって定められる。悪性化の現象の一つである転移は原発癌の種類により、転移を起こしやすい臓器が異なる。癌の転移は複合事象であり、原発腫瘍の増殖、癌細胞の原発巣からの離脱と周辺組織への浸潤・増殖から始まって、腫瘍血管新生、癌細胞の最寄りの血管内への侵入、血流による遠隔部位への移動と血管内皮細胞への接着・着床、更に、血管外への浸潤、遠隔部位(転移組織)での増殖の開始に続いて新たな腫瘍血管が新生され、やがて可視的な転移巣の形成に至るまでの複雑な反応カスケードから成り立っている。一般に、癌は、高い悪性度を有するものと、比較的に悪性度の低いものとに分けられる。しかし、悪性度の高い癌に対しては根本的な治療法は確立しておらず、患者は遂には死に至ることが極めて多い。

【0003】 また、癌の温熱療法(ハイパーサーミア; hyperthermia)とは、癌組織を加温することにより、腫瘍細胞を選択的に殺し、癌を治療しようとする方法であり、近年注目を浴びている。温熱療法による癌治療は、温熱の生物学的効果をみると、41～45℃の比較的温熱な加温で細胞致死効果が得られること、また放射線や抗癌剤などと併用することにより相乗的な効果が得られることなど、有利な点が多い。温熱療法による癌の治療法は、臨床においてはほとんどすべての各科で試みられている。しかし、温熱療法の問題点の一つは、加温後一過性に誘導される温熱耐性である。すなわち、癌細胞が1回目の加温により一時的に温熱耐性になるために、次の加温による殺細胞効果が減少する。温熱耐性とは、細胞(又は組織)を一度亜致死的な加温することにより、次の加温に対してその細胞(又は組織)が一過性に温熱抵抗性になることである。温熱耐性のため、現在ほとんどの施設において温熱療法を行うのは週1～2回に限定されているのが現状である。

【0004】 また、癌の化学療法においても、化学療法に殆ど反応しない肺癌や大腸癌などの固型癌が依然として存在する一方で、化学療法剤に反応する癌でも、やがて抗癌剤が効かなくなる耐性化が問題となっている。1988年のアメリカの統計によれば、1年間に診断された癌の4.9%が化学療法に最初から抵抗性を示す内因性耐性であり、4.7%が当初化学療法が有効で、腫瘍がいったん消退した後に再発した獲得性耐性とされている。これらの事実から、癌に対する化学療法の効果を妨げる最も重要な問題の一つは細胞毒性薬剤に対する耐性であることがわかる。

【0005】 また、多発性硬化症(multiple sclerosis, MS)は中枢神経白質を特異的に障害する炎症性脱髓性疾患であり、その発症機序に、神経線維を包んでいるミエリン鞘を免疫系が攻撃することが示されている自

己免疫疾患である。多発性硬化症は多くの場合、初期には急性憎悪・寛解を繰り返すが、その後徐々に進行性の経過をとるようになる。急性期の症状改善を目的としたものとして、副腎皮質刺激ホルモン（A C T H）や副腎皮質ステロイド剤が、また寛解期での再発予防や慢性進行型の症状進展防止を目的として、アザチオプリンやサイクロフォスファミドなどの免疫抑制剤が用いられてきた。しかし、現在、多発性硬化症患者に投与されている薬剤の多くは、その効果が期待されていたほどではなく、非特異的な療法で副作用も多くみられるなど、十分とはい难以難いのが現状である。多発性硬化症のより特異的な治療法の開発が期待されている。

【0006】一方、熱ショックタンパク質（heat shock protein；H S P、ストレスタンパク質ともいう）は、細胞を何らかのストレス、例えば熱、重金属、薬剤、アミノ酸類似体、又は低酸素（低濃度酸素）などで刺激することにより、細胞に発現される一群のタンパク質である。熱ショックタンパク質は、自然界に普遍的に存在しており、細菌、酵母、植物、昆虫、及びヒトを含む高等動物により産生される。

【0007】H S Pは、その種類は多種多様であるが、分子量の大きさからH S P 90ファミリー（例えば、90 k D又は110 k DのH S Pなど）、H S P 70ファミリー（例えば、70～73 k DのH S Pなど）、H S P 60ファミリー（例えば、57～68 k DのH S Pなど）、低分子H S Pファミリー（例えば、20 k D、25～28 k D、又は47 k DのH S Pなど）の4ファミリーに大別することができる。なお、本明細書においては、特定分子量を有するH S Pを、H S Pとその直後に記載する数字とによって示すものとし、例えば、分子量27 k DのH S Pを『H S P 27』と称するものとする。以上のように、H S Pには多くの種類が存在するが、これらは分子量だけでなく、構造、機能、又は性質などもそれぞれ異なるものである。ストレスへの応答に加えて、これらのタンパク質の中には構成的に合成されるものがあり、正常な環境の下で、タンパク質のフォールディング、アンフォールディング、タンパク質サブユニットの会合、タンパク質の膜輸送のような、必須の生理的な役割を演じていることが示されている。熱ショックタンパク質としてのこれらの機能は、分子シャペロンと称される。

【0008】H S P 27ファミリーに属するタンパク質の発現は、ヒト乳癌において、リンパ節転移、リンパや血管への浸潤、より短い生存率との間に顕著な相関がある（"J. Natl. Cancer Inst." 83: 170-178, 1991）。胃癌においてもH S P 27ファミリーに属するタンパク質はネガティブな予後因子であるとの報告がある（"Br. J. Surg." 78: 334-336, 1991）。H S P 27ファミリーに属するタンパク質の原発癌細胞における発現レベルが癌悪性度、特に癌の再発率と正の相関があるという報告

もある（"Breast Cancer Res. Treat." 12: 130, 1988；"Proc. Am. Assoc. Cancer Res." 30: 252, 1989）、H S P 27ファミリーに属するタンパク質の発現を抑制することにより、癌の悪性化を防止することが可能である。

【0009】癌の温熱療法で問題となる温熱耐性にH S P 27ファミリーに属するタンパク質が関与するという報告がある。ヒトH S P 27遺伝子をマウス又はハムスター細胞に導入して発現させたところ、熱ショック後に生き残る温熱耐性の細胞がH S P 27のタンパク質の量に依存して誘導され増加する（"J. Cell. Biol." 109: 7-15, 1989）。また、チャイニーズハムスター細胞で、H S P 27を定常的に発現するようになった変異株が熱耐性を獲得できるようになる（"J. Cell. Physiol." 137: 157, 1988）。 α -Bクリスタリンは、熱ショック処理で誘導され、H S P 27とアミノ酸配列の相同意が高いタンパク質であり、H S P 27ファミリーに属するタンパク質の一つであるが、 α -Bクリスタリンを過剰発現させた細胞も熱ストレスに対する耐性を獲得する（"J. Cell. Biol." 125: 1385-1393, 1994）。このことは、H S P 27ファミリーに属するタンパク質の発現を抑制することにより、温熱耐性を抑え、癌に対する温熱療法の効果を増強する可能性を示している。また、H S P 27ファミリーに属するタンパク質の発現と薬剤耐性とが相関するとの報告もある（"Breast Cancer Res. Treat." 23: 178, 1992；"Cancer Res." 51: 5245-5252, 1991）、H S P 27ファミリーに属するタンパク質の発現を抑制することにより、薬剤耐性を抑え、化学療法の効果を増強することも可能である。

【0010】多発性硬化症における免疫的に優性な抗原が、H S P 27ファミリーに属するタンパク質である α -Bクリスタリンであることが突き止められている（"Nature" 375: 739-740, 1995）。 α -Bクリスタリンは、多発性硬化症患者の神経組織中の発現が、非発病者の組織中の発現よりも強く、非常に免疫原性が高い（"Nature" 375: 798-801, 1995）。これらの事実は、多発性硬化症で自己抗原となっているのは、H S P 27ファミリーに属するタンパク質の1種である α -Bクリスタリンであり、ミエリン鞘における α -Bクリスタリンの発現を抑制することが多発性硬化症の根本的治療に結び付くことを示している。

【0011】

【発明が解決しようとする課題】本発明者らは、上記事情に鑑み、癌や多発性硬化症などの病気の患者の生理学的状態を有効に改善させ、前記の病気を効果的に治療することができる方法を開発するために、H S P 27ファミリーに属するタンパク質に対して合成抑制作用を示す化合物に関して、種々検討を重ねてきた。その結果、本発明者らは、意外にも、アロエの成分であるアロイン、又はその誘導体が、病態を示す組織の細胞におけるH S

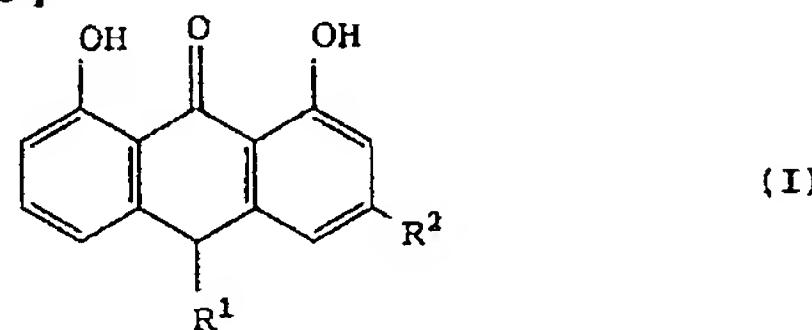
P27ファミリーに属するタンパク質の合成を特異的に抑制することを見出した。すなわち、アロイン誘導体を投与することによって、細胞内でのHSP27ファミリーに属するタンパク質の合成が抑制され、従って、癌や多発性硬化症などの病気の治療が可能であることを見出したのである。本発明はこうした知見に基づくものであり、癌や多発性硬化症などの病気を効果的に治療することができる、HSP27ファミリーに属するタンパク質の合成抑制剤を提供することを目的とする。

【0012】

【課題を解決するための手段】従って、本発明は、式

(I) :

【化3】



(式中、R¹は、ヘキソースの1位の水酸基を除いたヘキソース残基であり、R²は、炭素数1～3のヒドロキシアルキル基である)で表されるアロイン誘導体を有効成分として含有することを特徴とする、分子量16キロダルトンから40キロダルトンまでの間の熱ショックタンパク質(すなわち、HSP27ファミリーに属するタンパク質)の合成抑制剤に関する。

【0013】本明細書において、「HSP27ファミリー」とは、前記のとおり、分子量が16kD～40kDの熱ショックタンパク質群を意味する。HSP27ファミリーに属するタンパク質としては、例えば、哺乳動物のHSP27(すなわち、分子量27kDの熱ショックタンパク質)【若しくはHSP28(すなわち、分子量28kDの熱ショックタンパク質)】、トリのHSP25(すなわち、分子量25kDの熱ショックタンパク質)、又は酵母のHSP26(すなわち、分子量26kDの熱ショックタンパク質)などを挙げることができる。なお、一般的に、タンパク質の分子量は、例えば、分子量測定方法又は実験条件などの違いにより多少の差が生じるので、HSP27ファミリーに属するタンパク質の中には、例えば、哺乳動物におけるHSP27とHSP28のように、分子量表記が異なっていても、それらがアミノ酸配列の異なる別異のタンパク質であるのか、あるいは単に分子量表記のみが外見上異なる同一のタンパク質であるのかが、現在のところ明らかではないものも含まれている。HSP27ファミリーに属するタンパク質は、前記の低分子HSPファミリーに属する熱ショックタンパク質のうち哺乳動物において最も主要な熱ショックタンパク質であり、生物種を超えてよく保存された特徴を示す。しかし、HSP27ファミリーに属するタンパク質は、他の熱ショックタンパク質とは異なる

り、種ごとに異なる分子量を有しており、分子量16kD～40kDと、非常に多様なタンパク質である。また、HSP27とアミノ酸配列の相同性の高いα-Bクリスタリンも熱ショック処理で誘導され、HSP27ファミリーに属するタンパク質の一つである

【0014】

【発明の実施の形態】以下、本発明について詳細に説明する。本発明の合成抑制剤は、有効成分として前記式

(I)で表されるアロイン誘導体を含有する。本明細書においてヘキソース残基とは、ヘキソースの1位の水酸基を除いた残基である。前記ヘキソースとしては、例えば、アロース、アルトロース、グルコース、マンノース、グロース、イドース、ガラクトース、タロース、ブシコース、フルクトース、ソルボース、又はタガトースなどを挙げることができる。ヘキソースは、D-1体又はL-1体のいずれであってもよく、また、ピラノース型又はフラノース型のいずれであってもよい。好ましいヘキソースは、グルコースである。前記ヘキソース残基とアントラゼノン部分との結合は、グリコシド結合である。グリコシド1位の立体配置は、α-アノマー又はβ-アノマーのいずれであってもよい。

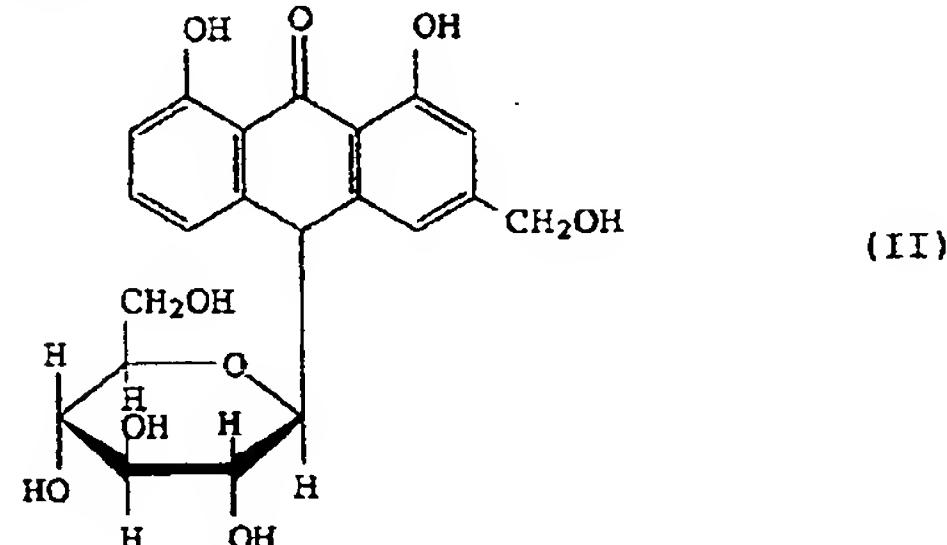
【0015】本明細書において炭素数1～3のヒドロキシアルキル基とは、1又はそれ以上の水酸基で置換されている炭素数1～3のアルキル基、例えば、ヒドロキシメチル基、ヒドロキシエチル基、3-ヒドロキシプロピル基、2-ヒドロキシプロピル基、1-ヒドロキシプロピル基、又は2-ヒドロキシ-1-メチルエチル基などであり、ヒドロキシメチル基が好ましい。

【0016】前記式(I)で表されるアロイン誘導体には、立体異性体が存在し、それらの任意の純粋の立体異性体又はそれらの混合物を、本発明の合成抑制剤の有効成分として用いることができる。

【0017】本発明の合成抑制剤において有効成分として使用することのできるアロイン誘導体としては、式

(II) :

【化4】



で表されるアロイン【aloin; 10-グルコピラノシル-1,8-ジヒドロキシ-3-(ヒドロキシメチル)-9(10H)-アントラゼノン】が好ましい。アロインは、例えば、アロエ等の生薬に含まれている。アロインには、立体異性体が存在し、アロインの任意の純

粋の立体異性体又はそれらの混合物を、本発明の合成抑制剤の有効成分として用いることができる。

【0018】本発明の合成抑制剤に含有されるアロイン誘導体は、化学合成によって、又は天然物から抽出して精製することによって、調製することができる。あるいは、市販品を用いてもよい。本発明の合成抑制剤において有効成分として用いるアロイン誘導体を、天然物から抽出する場合には、例えば、アロイン誘導体を含有する植物の全体又は一部分（例えば、全草、葉、根、根茎、茎、根皮、若しくは花）をそのまま用いて、又は簡単に加工処理（例えば、乾燥、切断、湯通し、蒸気加熱、若しくは粉末化）したもの（例えば、生薬）を用いて抽出する。抽出条件は一般的に植物抽出に用いられる条件ならば特に制限はない。アロインを含有する植物としては、これに限定するものではないが、例えば、アロエ・フェロックス・ミラー（*Aloe ferox Miller*）、アロエ・フェロックス・ミラーとアロエ・アフリカナ・ミラー（*Aloe africana Miller*）との雑種、又はアロエ・フェロックス・ミラーとアロエ・スピカタ・ベイカー（*Aloe spicata Baker*）との雑種などを使用することができる。

【0019】本発明におけるアロインを生薬から抽出する場合、これに限定するものではないが、例えば、アロエから抽出することが好ましい。アロエ（ロカイ；*Aloe*）とは、アロエ・フェロックス・ミラー、アロエ・フェロックス・ミラーとアロエ・アフリカナ・ミラーとの雑種、又はアロエ・フェロックス・ミラーとアロエ・スピカタ・ベイカーとの雑種などの葉から得た液汁を乾燥したものを意味し、それらの部分を単独であるいは任意に組み合わせて使用することができる。

【0020】本発明による合成抑制剤において有効成分として用いることのできるアロエ抽出物は、前記のアロインを含有していればよく、従って、アロエの粗抽出物を用いることができる。本発明で用いることのできるアロエ抽出物の製造方法としては、アロエを、水（例えば、冷水、温水、又は熱湯）によって抽出するか、又は有機溶媒を用いて抽出することによって、得ることができる。有機溶媒としては、例えば、炭素数1～6のアルコール（例えば、メチルアルコール、エチルアルコール、n-ブロピルアルコール、イソブロピルアルコール、若しくはブチルアルコール）、エステル（例えば、酢酸メチル、酢酸エチル、酢酸プロピル、若しくは酢酸ブチル）、ケトン（例えば、アセトン若しくはメチルイソブチルケトン）、エーテル、石油エーテル、n-ヘキサン、シクロヘキサン、トルエン、ベンゼン、炭化水素のハロゲン誘導体（例えば、四塩化炭素、ジクロロメタン、若しくはクロロホルム）、ピリジン、グリコール（例えば、プロピレングリコール、若しくはブチレングリコール）、ポリエチレングリコール、又はアセトニト

リルなどを用いることができ、これらの有機溶媒を単独、又は適宜組み合わせ、一定の比率で混合し、更には無水又は含水状態で用いることができる。水抽出又は有機溶媒抽出の方法としては、通常の生薬抽出に用いられる方法を用いることができ、例えば、（乾燥）アロエ1重量部に対し、水又は有機溶媒3～300重量部を用いて、攪拌しながら、その沸点以下の温度で加熱還流、常温で超音波抽出、あるいは冷浸することが望ましい。抽出工程は、通常は5分～7日間、好ましくは10分～60時間実施し、必要に応じて、攪拌等の補助的手段を加えることにより、抽出時間を短縮することができる。

【0021】抽出工程終了後、濾過又は遠心分離等の適当な方法により、水又は有機溶媒抽出液から、不溶物を分離して粗抽出物を得ることができる。なお、本発明の合成抑制剤において、天然物より抽出、分画したアロインを用いる場合には、前記の粗抽出物を特に精製することなく、そのまま使用してもよい。常法による水抽出物又は有機溶媒抽出物の他に、前記の粗抽出物を各種有機溶媒又は吸着剤等により、更に処理した精製抽出物も、本発明の合成抑制剤の有効成分として用いることができる。これらの粗抽出物及び各種の精製処理を終えた精製抽出物を含むアロエ抽出物は、抽出したままの溶液を用いても、溶媒を濃縮したエキスを用いても良いし、溶媒を留去し乾燥した粉末、更には結晶化して精製したものの、あるいは粘性のある物質を用いても良く、またこれらの希釈液を用いることもできる。こうして得られたアロエ抽出物は、アロエに含まれるアロインを含み、同時に原料のアロエに由来する不純物を含んでいる。

【0022】本発明の合成抑制剤は、アロイン誘導体、又はアロイン誘導体を含有する植物の抽出物、例えば、アロイン誘導体を含有する生薬の抽出物（特に、アロエ抽出物）を、それ単独で、又は好ましくは製剤学的若しくは獣医学的に許容することのできる通常の担体と共に、動物、好ましくは哺乳動物（特にヒト）に投与することができる。投与剤型としては、特に限定がなく、例えば、散剤、細粒剤、顆粒剤、錠剤、カプセル剤、懸濁液、エマルジョン剤、シロップ剤、エキス剤、若しくは丸剤等の経口剤、又は注射剤、外用液剤、軟膏剤、坐剤、局所投与のクリーム、若しくは点眼薬などの非経口剤を挙げることができる。これらの経口剤は、例えば、ゼラチン、アルギン酸ナトリウム、澱粉、コーンスター、白糖、乳糖、ぶどう糖、マンニット、カルボキシメチルセルロース、デキストリン、ポリビニルピロリドン、結晶セルロース、大豆レシチン、ショ糖、脂肪酸エステル、タルク、ステアリン酸マグネシウム、ポリエチレングリコール、ケイ酸マグネシウム、無水ケイ酸、又は合成ケイ酸アルミニウムなどの賦形剤、結合剤、崩壊剤、界面活性剤、滑沢剤、流動性促進剤、希釈剤、保存剤、着色剤、香料、矯味剤、安定化剤、保湿剤、防腐剤、又は酸化防止剤等を用いて、常法に従って製造する

ことができる。例えば、アロイン1重量部と乳糖99重量部とを混合して充填したカプセル剤などである。

【0023】非経口投与方法としては、注射（皮下、静脈内等）、又は直腸投与等が例示される。これらのなかで、注射剤が最も好適に用いられる。例えば、注射剤の調製においては、有効成分としてのアロイン誘導体、又はアロイン誘導体を含有する植物の抽出物、例えば、アロイン誘導体を含有する生薬の抽出物（特に、アロエ抽出物）の他に、例えば、生理食塩水若しくはリングル液等の水溶性溶剤、植物油若しくは脂肪酸エステル等の非水溶性溶剤、ブドウ糖若しくは塩化ナトリウム等の等張化剤、溶解補助剤、安定化剤、防腐剤、懸濁化剤、又は乳化剤などを任意に用いることができる。また、本発明の合成抑制剤は、徐放性ポリマーなどを用いた徐放性製剤の手法を用いて投与してもよい。例えば、本発明の合成抑制剤をエチレンビニル酢酸ポリマーのペレットに取り込ませて、このペレットを治療すべき組織中に外科的に移植することができる。

【0024】本発明の合成抑制剤は、これに限定されるものではないが、アロイン誘導体を、0.01～99重量%、好ましくは0.1～80重量%の量で含有することができる。また、アロイン誘導体を含有する植物の抽出物、例えば、アロイン誘導体を含有する生薬の抽出物（特に、アロエ抽出物）を有効成分として含有する本発明の合成抑制剤は、その中に含まれるアロイン誘導体が前記の量範囲になるように適宜調整して、調製することができる。なお、アロイン誘導体を含有する植物の抽出物、例えば、アロイン誘導体を含有する生薬の抽出物（特に、アロエ抽出物）を有効成分として含有する合成抑制剤を、経口投与用製剤とする場合には、製剤学的に許容することのできる担体を用いて、製剤化することが好ましい。本発明の合成抑制剤を用いる場合の投与量は、病気の種類、患者の年齢、性別、体重、症状の程度、又は投与方法などにより異なり、特に制限はないが、アロイン誘導体量として通常成人1人当たり1mg～10g程度を、1日1～4回程度にわけて、経口的に又は非経口的に投与する。更に、用途も医薬品に限定されるものではなく、種々の用途、例えば、機能性食品や健康食品として飲食物の形で与えることも可能である。

【0025】

【作用】上記したように、本発明の合成抑制剤に含有されるアロイン誘導体は、細胞内のHSP27ファミリーに属するタンパク質の合成を特異的に抑制する作用があるので、前記アロイン誘導体を投与すると細胞でのHSP27ファミリーに属するタンパク質の生合成が特異的に減少する。従って、前記アロイン誘導体は、例えば、HSP27ファミリーに属するタンパク質がその悪性化に関連する癌の予防及び治療、HSP27ファミリーに属するタンパク質がその療法への障害となる温熱耐性に関連する癌温熱療法の効果の増強、又はHSP27ファ

ミリーに属するタンパク質がその発症に関連する多発性硬化症などの自己免疫疾患の予防及び治療などに使用することができる。また、HSP27ファミリーに属するタンパク質の発現と薬剤耐性とが相関するとの報告もある（"Breast Cancer Res. Treat.", 23: 178, 1992; "Cancer Res.", 51: 5245-5252, 1991）、HSP27ファミリーに属するタンパク質の発現を抑制することにより、薬剤耐性を抑え、化学療法の効果を増強することも可能である。

【0026】

【実施例】以下、実施例によって本発明を具体的に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。

実施例1：ヒト培養癌細胞のHSP発現量の測定

（1）ヒト培養癌細胞の培養

神経腫瘍細胞株（神経芽細胞腫）SK-N-MC (ATCC HTB 10) を、非必須アミノ酸（L-アラニン8.9mg/1、L-アスパラギン・H₂O 15.0mg/1、L-アスパラギン酸13.3mg/1、L-グルタミン酸14.7mg/1、グリシン7.5mg/1、L-プロリン11.5mg/1及びL-セリン10.5mg/1）及び10%非動化ウシ胎児血清を含むMEM培地中に、5%二酸化炭素条件下で、熱ショック処理時以外は、37°Cで培養した。

【0027】（2）アロイン処理及び熱ショック処理
播種2日後の神経腫瘍細胞株（神経芽細胞腫）SK-N-MCの培地中に、最終濃度100μMになるように前記式（II）で表されるアロイン（一丸ファルコス）を添加し、24時間培養した。その後、45°Cにて15分間熱ショック処理をしてから、37°Cにて終夜培養した。対照試験は、アロインを添加しないこと以外は前記と同様に実施した。

【0028】（3）ヒト培養癌細胞でのHSP発現量の測定

前項（2）で処理した各細胞を、以下に示す方法によりホモジナイズし、HSP発現量をウェスタンプロット法にて測定した。すなわち、前項（2）で処理した細胞を、リン酸緩衝生理食塩水〔組成：KC1=0.2g/1, KH₂PO₄=0.2g/1, NaCl=8g/1, Na₂HPO₄（無水）=1.15g/1；以下、PBS（-）と称する〕で洗浄した後、ライシスバッファー〔lysis buffer〕〔1.0%NP-40、0.15M塩化ナトリウム、50mMトリス-HCl（pH8.0）、5mM-EDTA、2mM-N-エチルマレイミド、2mMフェニルメチルスルホニルフルオリド、2μg/mlロイペプチド及び2μg/mlペプスタチン〕1mlを加え、氷上で20分間静置した。その後、4°Cで12000rpmにて、20分間、遠心を行った。遠心後の上清10μlをPBS（-）790μlに加え、更にプロテインアッセイ染色液（Dye Reag

ent Concentrate：バイオラッド、カタログ番号500-00-06) 200 μlを加えた。5分間、室温にて静置した後、595 nmで吸光度を測定してタンパク質定量を行った。

【0029】タンパク質定量を行った試料を用いて、Laemmliのバッファー系 (Laemmli, N. K., "Nature", 283: pp. 249-256, 1970)にて、等量のタンパク質を含むライセートのSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った。電気泳動後、ブロッティング及びそれに続くブロッキングを行った。すなわち、タンパク質転写装置 (Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell: バイオ・ラッド、カタログ番号170-3946) を用いて、室温にて100 Vにて、0.45 μmニトロセルロース膜 (Schleicher & Schuell, カタログ番号401196) にゲルを密着させ、3時間ブロッティングを行った。ブロッティングバッファーとしては、0.025 Mトリス及び0.192 MグリシンよりなりpH 8.5に調整されたトリスグリシンバッファー (Tris Gly Running and Blotting Buffer; Enprotech, 米国マサチューセッツ州, カタログ番号 SA100034) にメチルアルコールを20%になるように加えて調製したバッファーを用いた。ブロッティング後、ニトロセルロース膜を10%スキムミルク (雪印乳業) - PBS (-) 溶液に室温にて30分間、インキュベートし非特異的結合をブロックした。

【0030】ブロッキング後、ニトロセルロース膜の上で、抗ヒトHSP27マウスモノクローナル抗体 (StressGen, Victoria, B.C., Canada, カタログ番号 SPA-800) により、1次抗体反応を行った。この抗ヒトHSP27マウスモノクローナル抗体は、ヒト乳癌細胞株MC-F7 (ATCC HTB 22) より単離したHSP24を免疫原として作製した抗体であり ("Cancer Res.", 42, 4256-4258, 1982)、HSP27 (ヒトHSP27、チンパンジーHSP27、及びヒツジHSP27) と特異的に反応し ("Cancer Res.", 42, 4256-4258, 1982; "Cancer Res.", 43, 4297-4301, 1983)、HSP24及びHSP28とも特異的に反応する。1次抗体反応後、PBS (-) で5分間ずつ、溶液を取り替えて2回の洗浄をスロー・ロッキング・シェイカーによって行い、更にPBS (-) - 0.1% Tween 20 (バイオ・ラッド、カタログ番号170-6531) 溶液で15分間ずつ、溶液を取り替えて4回の洗浄を行った。最終的に、PBS (-) で5分間ずつ、2回の洗浄を行った。

【0031】洗浄終了後、ペルオキシダーゼ標識ヤギ抗マウスIgG抗体 (CAPPY, カタログ番号55550) を、2

%スキムミルクを含むPBS (-) 溶液で5000倍に希釈して調製した抗体溶液5mlを用いて、2時間、2次抗体反応を行った。反応終了後、ニトロセルロース膜に関して、PBS (-) 溶液で5分間ずつ溶液を変えて2回、更にPBS (-) - 0.1% Tween 20溶液で15分間ずつ溶液を変えて5回の洗浄をスロー・ロッキング・シェイカーにより行った。最後にPBS (-) 溶液で5分間ずつ2回の洗浄を行った。余分なPBS (-) 溶液を除去した後、ウェスタンブロッティング検

10 出試薬 (ECL Western blotting detection reagent; Amersham, カタログ番号RPN2106) をニトロセルロース膜上に振りかけ、1分間インキュベートした後、余分な検出試薬を除去し、ニトロセルロース膜をラップに包み、反応面をX線フィルム (コダック X-OMAT, AR, カタログ番号165 1454) に密着させて露光し、現像してHSP27の有無の検討を行った。

【0032】その結果、対照試験、すなわち、アロインを添加しなかった神経腫瘍細胞株 (神経芽細胞腫) SK-N-MCでは、分子量約27 kDのバンドが一本検出された。なお、分子量は、前記抗ヒトHSP27マウスモノクローナル抗体との結合、及び分子量マーカー (ダイズトリプシンインヒビター及びウシカーボニックアンヒドライゼ) により決定した。アロインを添加した神経腫瘍細胞株 (神経芽細胞腫) SK-N-MCでは、分子量約27 kDのバンドが検出されなかった。すなわち、アロインは、HSP27の発現を抑制する合成抑制剤の活性を有するものと結論することができる。

【0033】

【発明の効果】以上詳述したように、アロイン誘導体は、細胞内のHSP27ファミリーに属するタンパク質の発現を抑制する合成抑制剤の活性を有する。従って、アロイン誘導体を投与することにより、例えば、HSP27ファミリーに属するタンパク質がその悪性化や温熱療法の効果の減少に関連する癌、その発症に関連する多発性硬化症などの自己免疫疾患の患者の生理学的状態を有効に改善させ、前記病気を効果的に治療することができる。また、HSP27ファミリーに属するタンパク質発現と薬剤耐性とが相関するとの報告もあるので ("Breast Cancer Res. Treat.", 23: 178, 1992; "Cancer Res.", 51: 5245-5252, 1991)、HSP27ファミリーに属するタンパク質の発現を抑制することにより、薬剤耐性を抑え、化学療法の効果を増強することも可能である。

フロントページの続き

(51) Int. Cl.⁶ 識別記号 庁内整理番号 F I
C 07H 7/04 C 07H 7/04 技術表示箇所

BEST AVAILABLE COPY